Ausdruckswert zukommt. Dafür spricht im weiteren, dass *Sepietta obscura* auf festem Untergrund zuweilen Eingrabbewegungen durchführt, und zwar nicht nur die der 1. Phase, was auch bei *Sepiola* zu beobachten ist, sondern anschliessend die typischen Armbewegungen der 2. Phase; ferner, dass auch nach vollständiger Bedeckung mit Sand die Dorsolateralarme noch arbeiten, wobei sich dem Beobachter der Eindruck aufdrängt, das Tier „koste" die weitausholenden Bewegungen aus, die mit zunehmendem Alter immer variationsreicher werden. Sofern wir das Eingraben als reines Tarnverhalten interpretieren, kann dem so ausgeprägten Armeinsatz nur noch eine teilweise Zweckmässigkeit zugesprochen werden. Dem fügt sich die überraschende Beobachtung bei, dass völlig eingegrabene, unsichtbare Tiere als Schreckreaktion Tintenwolken aus dem Sand schiessen und dadurch ihren Standort „verraten". Dies ist sowohl bei *Sepietta obscura* als auch bei *Sepiola rondeleti* zu beobachten, wenn man sich etwa plötzlich nah über die Wasseroberfläche beugt.

Schliesslich sei noch auf zwei Besonderheiten hingewiesen, die in direktem Zusammenhang mit dem Leben im Sand stehen. Die dorsale Stellung der Pupille bei eingegrabenen Tieren hat NAEF (1923) bereits ausführlich beschrieben. Als dynamische Anpassung an das Leben in eingegrabenem Zustand muss die spezielle Atemtechnik von Sepioliden wie von *Sepia* gedeutet werden. Anstelle der Mantelkontraktionen und — dilatationen, durch die das Atemwasser in die Mantelhöhle gesaugt und durch den Trichter ausgeblasen wird, tritt bei ihnen im Ruhezustand eine reine Trichteraktivität, die bei völlig bewegungslosem Mantelsack abläuft: zum „Ausatmen" wird der Trichter zurückgezogen, dabei gleiten die Ränder der Trichtertasche, dem Mantel eng anliegend, zurück, und das Wasser verlässt die Mantelhöhle durch das Trichterrohr; anschliessend wird der Trichter vorgezogen, und die kollabierenden Ränder der Trichtertasche lassen frisches Wasser in die Mantelhöhle einströmen. Diese Trichteraktivität ist bereits in späteren Embryonalstadien zu beobachten.

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, wieweit der Feinheitsgrad des Sandes für die Atmung der Tiere von Bedeutung ist. Eine Bevorzugung relativ groben Sandes könnte durchaus ihre Erklärung in der Notwendigkeit eines guten Wasseraustausches durch die Sandoberfläche finden.

ZUSAMMENFASSUNG

Das Eingraben in Sand bei Sepioliden folgt einem Verhaltensmuster, das bereits vor dem Schlüpfen festgelegt ist und das sich innerhalb der beobachteten Arten *(Sepiola robusta, S. affinis* (?), *S. rondeleti, S. ligulata, Sepietta neglecta* und *S. obscura)* nicht grundsätzlich ändert.

In einer 1. Phase wird durch alternierend vor- und rückwärtsgerichteten Trichterstrahl Sand aufgewirbelt, wobei das Tier in die entstehende Mulde

einsinkt und vom zurückfallenden Sand mehr oder weniger vollständig bedeckt wird. In einer 2. Phase wischen die Dorsolateralarme in weit ausholender Bewegung Sand über die noch unbedeckten Kopfpartien. Weder bei Sepioliden noch bei *Sepia* erfüllen die Flossen eine Grabfunktion.

Bei *Sepietta* ist die mittlere Dauer der 2. Phase länger als die der ersten, bei *Sepiola* dagegen kürzer. Besonders bei *Sepietta* scheint der 2. Phase ein bedeutender Ausdruckswert zuzukommen. Die Grabaktivität äussert sich einer offenbar artspezifischen Erregbarkeit entsprechend.

In mehreren Versuchsserien wurden Rückwirkungen des Substrates (Sand verschiedenen Feinheitsgrades) auf das Grabverhalten der Tiere untersucht.

Résumé

L'enfouissement dans le sable chez les Sépiolidés est l'expression d'un comportement qui est déjà fixé avant l'éclosion du jeune animal et qui ne varie pas parmi les espèces étudiées *(Sepiola robusta, S. affinis* (?), *S. rondeleti, S. ligulata, Sepietta neglecta* et *S. obscura).*

Dans une première phase, le sable est soulevé en tourbillons par des jets d'eau de l'entonnoir dirigés alternativement vers l'avant et vers l'arrière, et l'animal s'enfonce dans le creux ainsi formé (Abb. 2a-e). Dans une deuxième phase, les deux bras dorsolatéraux s'étendent sur la surface du substrat et ramassent du sable dans une vaste aire autour de la tête pour couvrir celle-ci et la partie nuquale (Fig. 2f-i). Les nageoires n'ont aucune fonction directe d'enfouissement, ni chez les Sepiolidés ni chez *Sepia.*

Chez *Sepietta*, la durée moyenne de la deuxième phase est plus longue que celle de la première; chez *Sepiola*, par contre, elle est plus courte. Chez *Sepietta* en particulier, la deuxième phase semble avoir une expressivité importante. L'activité d'enfouissement va de pair avec une excitabilité apparemment spécifique.

Au cours de plusieurs séries d'expériences, nous avons étudié les réactions vis-à-vis de substrats variés (sables de granulométrie différente).

Summary

The sand burrowing in Sepiolids shows a behavioural pattern that is well established at the beginning of the postembryonic life and that shows no basic difference among the investigated species *(Sepiola robusta, S. affinis* (?), *S. rondeleti, S. ligulata, Sepietta obscura, S. neglecta).*

In a first phase, the sand is whirled up by jets of water from the funnel that is alternately directed anteriorly and posteriorly while the animal gradually settles down (Fig. 2a-e). In a second phase, the dorsolateral arms are streched out over the surface of the substratum to gather sand particles in a circular area around

the head in order to cover the animal entirely (fig. 2f-i). The fins have no function in burrowing, neither in Sepiolids nor in *Sepia.*

In *Sepietta*, the mean length of time of the second phase is greater than that of the first phase; in *Sepiola*, it is less. In *Sepietta* particularly, the second phase seems to play a certain role of expression. The burrowing activity manifests itself in accordance with an evidently specific excitability.

In several experiments, the reactions to differences in the substratum (sand with varying particle size) were studied.

LITERATUR

Jaeckel, S. G. A. 1958. *Cephalopoden*, in: Tierwelt der Nord- und Ostsee. IX b 3: 479-723. Leipzig.

Levy, F. 1912. *Ueber die Copula von Sepiola atlantica d'Orb.* Zool. Anz. 39: 284-290.

Naef, A. 1923. *Die Cephalopoden*, in: Fauna Flora Golf. Neapel, 35. Monogr. (I) 1 Berlin.

Racovitza, E. G. 1894. *Notes de Biologie. III. Moeurs et reproduction de la Rossia. macrosoma (D. Ch.).* Arch. Zool. expér. gén. (3) 2: 491-539.

Nº 32. **P. S. Chen** und **R. Bühler.** — Isolierung und Funktion des Sexpeptids bei *Drosophila melanogaster.* [1] (Mit 3 Textabbildungen)

Zoologisch-vergl. anatomisches Institut der Universität Zürich.

In einer früheren Arbeit haben wir ein Peptid in den Paragonien von adulten Männchen von *Drosophila melanogaster* lokalisiert (Chen und Diem, 1961). Nach seiner papierchromatographischen Beweglichkeit und Aminosäurenzusammensetzung entspricht dieses Peptid sehr wahrscheinlich dem Sexpeptid, welches von Fox (1956*a*, *b*) in Extrakten der ganzen Fliegen gefunden wurde. Garcia-Bellido

[1] Ausgeführt und herausgegeben mit Unterstützungen durch den Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung und die Georges und Antoine Claraz-Schenkung.

(1964) zeigte, dass Transplantation von Paragonien in virginelle Weibchen einen starken Anstieg der Fekundität bewirkt. Ein ähnlicher Anstieg der Fekundität wurde beobachtet bei Injektion des Paragoniensekretes. Die Resultate von GARCIA-BELLIDO wurden bestätigt durch LEAHY (1966) und MERLE (1969). Es muss nun gezeigt werden, dass das Sexpeptid wirklich das aktive Prinzip für die Stimulation der Eiablage ist. Um diesen Punkt zu klären, isolierten wir das Peptid aus einer grossen Anzahl Männchen von *Drosophila* mit Hilfe der präparativen Ionenaustausch-Chromatographie. Getestet wurde die reine Substanz, indem wir sie in virginelle Weibchen injizierten.

MATERIAL UND METHODE

Als Untersuchungsmaterial dienten 8-tägige adulte Fliegen des Wildtyps (Sevelen) von *Drosophila melanogaster*. Ca. 0,2 bis 5 gr. Fliegen wurden entweder in 80% Methanol oder 5% Trichloressigsäure homogenisiert. Nach der Zentrifugation wurde die überstehende Lösung durch Ausschütteln mit Chloroform oder Aether und Chloroform gereinigt und bis zur Trockne eingedickt. Die Trockensubstanz wurde in bidestilliertes Wasser oder 0,1 *n* HCl aufgenommen. Die Auftrennung der in den Extrakten enthaltenen ninhydrinpositiven Substanzen geschah mit Hilfe der Ionenaustausch-Chromatographie, gemäss den Angaben von SPACKMAN et *al.* (1958). Einzelheiten zur Identifikation und quantitativen Bestimmung der verschiedenen Aminosäuren finden sich bei CHEN und HANIMANN (1965). Mittels des „Stream Dividing Systems" konnte ein Teil des Eluats nach Elution aus der präparativen Harzsäule in einem Fraktionskollektor gesammelt werden. Jede Fraktion wurde auf dem Chromatogramm automatisch markiert, damit man sofort feststellen konnte, in welchem Tubus sich das Sexpeptid befand. Die Fraktionen mit dem Sexpeptid wurden mit Hochspannungselektrophorese bei pH 1,5 (8% HCOOH) und 2100 Volt entsalzt (siehe CHEN et *al.* 1968).

Für die Injektion wurde das entsalzte Peptid im Eksikkator über Phosphorpentoxid und NaOH getrocknet und anschliessend in wenig Insekten-Ringer-Lösung (BODENSTEIN, 1946) aufgenommen und das pH auf 6-7 eingestellt. Von dieser Lösung wurde mit Hilfe einer Mikrospritze ca. 0,03 µl in jedes Weibchen gespritzt. Bei den verschiedenen Serien entsprach die gespritzte Menge Peptid ca. 1/3 oder 1/15 einer Paragoniendrüse. Als Kontrollen dienten gleichaltrige Weibchen, gespritzt nur mit Ringerlösung, virginelle Weibchen ohne Injektion und befruchtete Weibchen. Die Fliegen wurden einzeln in kleinen Glastuben gehalten, die befruchteten Weibchen mit je zwei Männchen zusammen. Das Futter wurde auf einem Blechtellerchen täglich frisch in die Tuben gebracht. Ebenfalls täglich wurden die gelegten Eier jedes Weibchens während einer Zeitdauer von 14 Tagen gezählt.

Ergebnisse und Diskussion

Sorgfältige Ueberprüfung des Chromatogramms ergab, dass bei den Männchen ein hoher Peak in der sauren Region zwischen Phosphoserin und Glycerophosphoäthanolamin erscheint. Dieser wurde nach ca. 100 Minuten (50 ml Eluat) bei pH 3,28 und 50° C aus der Harzsäule eluiert (Peak SP, bezeichnet durch einen

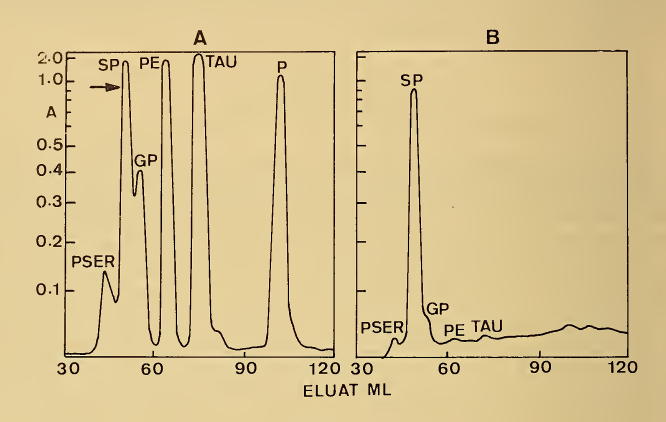


Abb. 1.

A. Chromatogramme der sauren ninhydrinpositiven Komponenten aus 8-tägigen Männchen von *Drosophila melanogaster* (Konzentration 0,15 gr Frischgewicht pro 1,5 ml). B. Chromatogramm eines methanolischen Extraktes von 230 Paragonienpaaren, herausseziert aus 8-tägigen Männchen. Ordinate: Absorption bei 570 mm. Abszisse: Volumen des Eluats in ml. In beiden Diagrammen sind nur die ersten 120 ml Eluat aufgezeichnet. Das Sexpeptid (SP) ist durch einen Pfeil bezeichnet. PSER, Phosphoserin; GP, Glycerophosphoäthanolamin; PE, Phosphoäthanolamin; TAU, Taurin; P, ein weiteres Peptid.

Pfeil in Abb. 1 A). Verschiedene Tatsachen lassen darauf schliessen, dass dieser Peak das Sexpeptid anzeigt. Der Peak befindet sich sehr nahe bei Tyrosin-O-phosphat. Wie aber frühere Untersuchungen zeigten, ist die Konzentration dieses Phosphatesters in Adultstadien sehr gering (Chen und Hanimann, 1965, Mitchell und Lunan, 1964). Bis jetzt wurden keine registrierbaren Mengen davon in den Fraktionen, die das Sexpeptid enthalten, gefunden. Weiter wurden bis jetzt keine sexuellen Unterschiede im Gehalt von Tyrosin-O-phosphat bei adulten *Drosophila-Fliegen* nachgewiesen. Man kann also Tyrosin-O-phosphat nicht mit dem Sexpeptid verwechseln.

Nachprüfung mit zweidimensionaler Papierchromatographie ergab, dass die entsalzte Probe an dieselbe Stelle wandert wie das Sexpeptid (siehe Fox et *al.*, 1959, Chen und Diem, 1961). Einen weiteren Beweis dafür, dass der Peak das Sexpeptid anzeigt, gibt die Auftrennung eines Extraktes, der nur aus Paragoniendrüsen hergestellt wurde. Dazu wurden 230 Paragonienpaare aus adulten Männchen herausseziert und mit Methanol extrahiert. Auf dem Chromatogramm (Abb. 1 B)

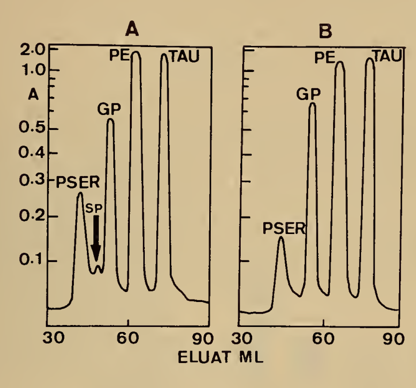


Abb. 2.

Vergleich der Chromatogramme zwischen befruchteten (A) und virginellen (B) Weibchen In beiden Diagrammen sind nur die ersten 90 ml Eluat aufgezeichnet.
Für weitere Erläuterungen siehe Text in Abbildung 1.

kann man nur einen einzigen grossen Peak erkennen. Dieser Peak erscheint an genau derselben Stelle wie das Sexpeptid auf dem Chromatogramm ganzer Männchen. Wie sich aus der Höhe des Peaks berechnen lässt, stimmt die Menge des Sexpeptids, die in den Paragonien allein enthalten ist, ziemlich genau mit derjenigen aus den ganzen Männchen überein. Das beweist, dass das Sexpeptid nur in den Paragonien gebildet wird.

Ein weiterer interessanter Punkt ist das Vorhandensein eines sehr niederen aber scharf abgegrenzten Peaks an derselben Stelle wie das Sexpeptid auf dem Chromatogramm von befruchteten Weibchen (Abb. 2 A). Untersucht man aber virginelle Weibchen, so findet man dort keinen Peak, im Gegensatz zu Proben aus befruchteten Weibchen (Abb. 2 B). Dies deutet darauf hin, dass das Sexpeptid während der Kopulation von den Männchen in die Weibchen übertragen wird.

Um die Wirkung des Sexpeptides auf die Fekundität zu testen, wurde das gereinigte Peptid in ein- bis zweitägige unbefruchtete Weibchen gespritzt. Abbildung 3 zeigt die Ergebnisse dieses Versuches. Man erkennt einen 2- bis 3-fachen Anstieg der Zahl gelegter Eier, verglichen mit der Eizahl virgineller, ungespritzter Weibchen. Der Stimulationseffekt scheint konzentrationsabhängig zu sein. Weiterhin zeigt sich, dass eine einzige Injektion genügt, um die Fekundität

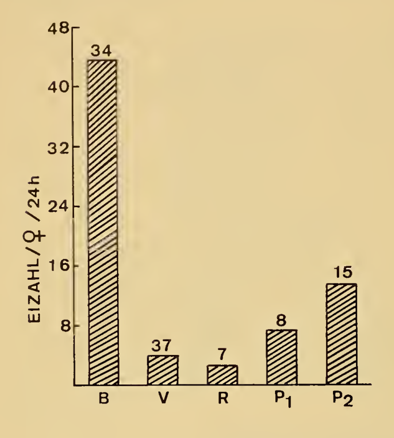


Abb. 3.

Oviposition bei Drosophila-Weibchen am 9. Tag nach Injektion des Sexpeptides. B, befruchtete Weibchen; V, virginelle Weibchen ohne Injektion; R, virginelle Weibchen nach Injektion mit Ringerlösung; P_1, virginelle Weibchen nach Injektion einer Menge von Sexpeptid, die ca. 1/15 einer Drüse entspricht; P_2, virginelle Weibchen nach Injektion einer Menge von Sexpeptid, die ca. 1/3 einer Drüse entspricht. Die Zahl oberhalb jeder Säule bedeutet die Anzahl der untersuchten Weibchen.

während der ganzen Legezeit auf einem hohen Niveau zu halten. Die Injektion von reiner Salzlösung zeigt keinen stimulierenden Effekt auf die Fekundität.

Somit haben wir nachgewiesen, dass die Injektion eines einzigen Peptides aus den Paragoniendrüsen denselben Effekt hat wie Injektion von Rohextrakten oder Transplantation ganzer Drüsen. Allerdings war der stimulierende Effekt bei der Injektion des reinen Peptides kleiner als derjenige bei den Transplantationsversuchen. Dies ist aber verständlich, da die sekretorische Tätigkeit der transplantierten Drüsen im Wirt andauert, während hier jede Fliege nur eine einmalige Peptiddosis erhielt. Vorderhand bleibt der Mechanismus der Stimulation noch unklar. Unsere weiteren Untersuchungen über den Turnover, die Synthese sowie die genetische Kontrolle des vorliegenden Peptids sind noch im Gang.

Zusammenfassung

Mit Hilfe der präparativen Ionenaustausch-Chromatographie wurde die Paragoniensubstanz (Sexpeptid) aus adulten Männchen von *Drosophila melano-*